

研究快报

人表皮生长因子受体在大肠杆菌
菌膜上功能性表达*

王雨田 胡家露 高磊¹⁾ 陈苏民¹⁾ 杨胜利²⁾ 龚毅²⁾ 樊代明 张学庸

(第四军医大学西京医院, 西安 710033)

摘要 为将人表皮生长因子 (EGF) 受体膜外第 III 功能区 (hEGF-R III) 表达于大肠杆菌菌膜上, 重组构建了 EGF-R III 表达载体, 并转化获得大肠杆菌表达株. 放射性受体分析发现¹²⁵I-EGF 可与表达菌特异性结合, 其特异性结合量随反应的时间和温度而变化, Scatchard 分析显示表达菌表达单一亲和性受体, 其解离常数为 3.0×10^{-11} mol/L, 每个细菌约有 738 个结合位点. 免疫电泳显示 EGF-R III 多分布于细菌菌膜上.

关键词 表皮生长因子受体, 大肠杆菌, 放射受体分析, 免疫电泳

人表皮生长因子受体 (hEGF-R) 是 170 ku 的跨膜蛋白, 膜外部分具有配体结合功能, 膜内部分具有酪氨酸激酶活性. 现证实 hEGF-R 有多个配体, 如表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、两性调节生长因子 (AR)、肝素结合性表皮生长因子 (HB-EGF) 及 β 细胞调节因子 (BTC), 称为 EGF 家族^[1]. 配体与受体结合, 激活细胞内多种信号转导途径, 参与调控多种细胞生长、增殖、分化和转化, 并与消化溃疡的形成、修复及肿瘤的发生、发展密切相关.

本研究利用微生物表面呈现技术, 将 hEGF-R 膜外配体结合区表达于大肠杆菌菌膜上, 构建功能性表达 hEGF-R 的大肠杆菌模型, 具有应用前景^[2]. 此研究可能为大规模筛选 EGF 家族新成员或其拮抗剂、EGF-R 功能结构的深入研究、生物活性 EGF 水平的检测、以及分析生物活性 EGF 水平与消化系病理、生理现象的关系及与肿瘤发生、发展、转化的关系研究提供新的方法和途径.

已有研究证实 hEGF-R 膜外部分可分为四

区, 第 I 区、第 III 区是受体与配体结合区, 其中第 III 区起关键性作用^[3]. 据此设计合成引物: 5' CCAACCATGGTCCGCAAGTGTAAAG-AGTGC3', 5' GCAGATCTTTAGCACCAAGG-CATGGCAGAC3' (5' 引物末端加 Nco I 位点, 3' 引物末端加 Bgl II 位点), PCR 结果从全长 hEGF-R cDNA 质粒上扩增出一条约 560 kb 的 DNA 片段, 平端化后将其克隆于 pUC19, 测序结果证实此片段与 hEGF-R 膜外第 III 区编码序列 (hEGF-R III) 相同. 用 Nco I 和 Bgl II 双酶切, 切出 hEGF-R III 片段, 定向克隆于表面呈现载体 pLB₂ 中, 构建表达载体 pLER III. 由于 pLB₂ 载体在其强启动子 Ptac 后, 编码有大肠杆菌表面蛋白 LamB 的信号序列及其 N 端 279 个氨基酸残基序列, 因此, 将 hEGF-R III 嵌合其后, 就可能在 大肠杆菌菌膜上呈现 hEGF-R 第 III 区. 用 pLER III 转化大肠杆菌

* 国家自然科学基金 (39470785) 及全军医学卫生青年基金 (96Q078) 资助.

¹⁾ 第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032.

²⁾ 中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233.

收稿日期: 1997-04-14, 修回日期: 1997-07-28

JM109, 获得 hEGF-R III 表达菌, 经 IPTG 1 mmol/L, 37℃ 诱导 5 h, SDS-PAGE 证实此表达菌高表达相对分子质量为 2×10^4 左右的蛋白, 其表达的蛋白量约占细菌总蛋白的 10%. EGF-R 放射受体分析发现此表达菌可与 ^{125}I -EGF 结合, 具有温度、时间效应. 4℃ 时, 随时间延长特异性结合缓慢增加, 37℃ 时 2 h 内特异性结合迅速增加, 2 h 后增加缓慢. ^{125}I -EGF 与表达菌结合具有特异性, EGF、TGF- α 能明显抑制此种结合, 而胰岛素、干扰素则无此作用. ^{125}I -EGF 与表达菌结合具有饱和特征, 随 ^{125}I -EGF 浓度增加, 反应的特异性结合迅速增加, 当 ^{125}I -EGF 浓度超过一定量时, 特异性结合量增加减慢, 所得数据经 Scatchard 作图分析为一直线, 提示表达菌表达单一亲和性的 EGF-R, 其解离常数 (K_d) 约为 3.0×10^{-11} mol/L, 每个细菌菌体约有 738 个结合位点 (图 1). 用胶体金标记 EGF

大肠杆菌菌膜上, 达到预期目的. 大肠杆菌菌膜功能表达 hEGF-R 模型的建立为后续的研究奠定了良好的基础.



图 2 EGF-胶体金 (10 nm) 与表达菌结合 (↑) 的电镜定位 ($\times 50\,000$)

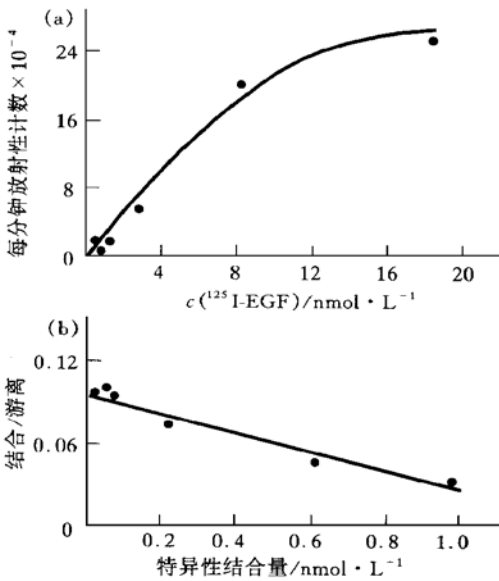


图 1 ^{125}I -EGF 与表达菌结合曲线 (a) 及 Scatchard 分析曲线 (b)

制成免疫金探针, 电镜结果显示胶体金颗粒部分分布于菌体表面, 细菌有破损时大量胶体金颗粒分布于菌体内部, 多呈弧形分布于细菌内膜 (图 2), 结果表明 hEGF-R III 功能性表达于

致谢 Axel Ullrich 博士 (Department of Molecular Biology, Max plank Institute of Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany) 慷慨提供了 EGF-R 全长 cDNA, 本校生化教研室王成济教授审阅全稿, 谨致谢意.

参 考 文 献

- 1 王雨田, 胡家露, 金伯泉. 表皮生长因子相关蛋白家族. 细胞与分子免疫学杂志, 1996, 12 (3): 64~ 67
- 2 王雨田, 胡家露, 陈苏民等. 微生物表面呈现技术及应用. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24 (5): 422~ 426
- 3 Lax I, Bellot F, Howk R *et al.* Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. EMBO J, 1989, 8 (2): 421 ~ 427

Functional Expression of Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) in Membrane of *E. coli*. WANG Yutian, HU Jialu, GAO Lei¹⁾, CHEN Sumin¹⁾, YANG Shengli²⁾, GONG Yi²⁾, FAN Daiming, ZHANG Xueyong (*Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China;* ¹⁾ *Department of Biochemistry, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;* ²⁾ *Shanghai Bioengineering Investigation Center, The*

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China).

Abstract An *E. coli* strain which could express domain III of the extracellular region of the human EGF-R (EGF-R III) in its membrane had been obtained. The results of EGF receptor radiobinding assay showed that ¹²⁵I-EGF could bind specifically to the intact bacterial body, the amount of specific binding varied with the time and temperature of the reaction. The data of

Scatchard analysis indicated that the number of the human EGF-R III expressed in the bacteria was about 738 sites/cell, and its dissociation constant was about 3.0×10^{-11} mol/L. The sites of the bacteria to which EGF bound were discovered mainly on its membrane by immunoelectronmicroscopy.

Key words epidermal growth factor receptor, *E. coli*, receptor radiobinding assay, immunoelectronmicroscopy

大肠杆菌基因组中存在 Era 亲和蛋白的基因

陈南春 陈苏民 高磊 郝晓萌 高辉 金晶 马小峰

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 构建了一个大肠杆菌基因组 DNA λ ZAP 表达文库, 以 Dig 标记的 Era 为探针, 从 4×10^4 噬斑中筛选到一个与探针呈特异结合的噬斑, 说明大肠杆菌基因组中确有 Era 亲和蛋白基因存在. 将该噬斑体中插段 DNA 前 800 bp 的测序结果与 1996 年底完成的大肠杆菌基因组全序列作同源性比较, 发现该插段序列位于大肠杆菌基因组的第 267 section.

关键词 大肠杆菌, 基因组表达型文库, Era 结合蛋白

era 基因是大肠杆菌 rnc 操纵子的一个成员, 在野生型大肠杆菌中表达水平极低, 但却是大肠杆菌生存繁殖所必需的基因^[1]. 已经证明该基因产物 Era 蛋白可与鸟苷酸结合, 具有 GTPase 活性, 属于 G 蛋白^[2,3]. 尽管做过许多研究, 但对于大肠杆菌中这种 G 蛋白的功能依然不清楚. 作者设想: Era 既然是 G 蛋白, 则它应与其他 G 蛋白一样, 有相应的亲和蛋白存在. 为寻找 Era 亲和蛋白及其基因, 作者构建了一个表达型大肠杆菌基因组 DNA 文库, 以 Dig 标记 Era 为探针, 从该文库中筛选到了一个能与探针特异结合的噬斑, 表明大肠杆菌基因组中存在 Era 亲和蛋白基因. 现将主要方法及结果报告如下.

1 表达型大肠杆菌基因组文库的构建

取大肠杆菌基因组 DNA 以 Sau3A1 在控

制条件下作部分酶解, 使成 1~ 10 kb 片段; λ ZAP 载体 DNA 以 BamH I 水解至完全, 并以牛肠碱性磷酸酶脱去 5' 端磷酸. 载体与 1~ 10 kb 插段以 T4 DNA 连接酶连接后, 作体外包装. 测包装后的原始库容量为 10^6 pfu/μg DNA; 蓝/白筛选鉴定, 含插段的白色噬斑占 98.6%; 经扩增一次后的扩增库, 滴度为 10^{12} pfu/ml.

2 Dig 标记 Era 探针的制备

Era 蛋白按陈苏民的方法制备^[4]. 取 Era 77 μg, 溶于 1.5 ml 磷酸钾缓冲液中, 加 Dig-活酯 5 μl 混匀, 室温放 3 h, 探针的 Dig 标记即告完成. 将标记探针点于 NC 膜上, 测出

* 国家自然科学基金资助项目 (39670006).
收稿日期: 1997-07-08, 修回日期: 1997-09-15